©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Atmungsenzymsysteme von Avena in ihrer Beziehung zum Wachstum

Von Nikolaus R. Hansl[1]

Aus dem Department of Botany, Mc.Gill University Montreal, Canada

Mit 6 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Jänner 1955)

Einleitung.

Beim Versuch, die intrazelluläre Verteilung und die physiologische Rolle der Atmungsenzymsysteme des Avena-Keimlings wenigstens teilweise klarzustellen, wurde die Wirkung von verschiedenartigem Sauerstoffpartialdruck sowie von Wachstums- und Atmungshemmstoffen auf den jungen Haferkeimling geprüft. Albaum und Eichel (1), Bonner (2), Brown und Goddard (3) und Maxwell (4) hatten das Vorkommen eines Zystochromsystems in ganzen Avena-Keimlingen, in Avena-Koleoptilen, in Weizenembryos wie auch in Maisembryos sehr wahrscheinlich gemacht; experimentell wurde hier überall eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme von homogenisiertem Pflanzenmaterial nach Zugabe von reinem tierischem Zytochrom c erzielt, Als Substrat diente in den meisten Fällen p-Phenylendiamin.

Bekanntlich ist in dem System

Luftsauerstoff
↓ Zytochromoxydase
Zytochrom c
↓
p-Phenylendiamin

das Zytochrom c in pflanzlichen Gewebepräparaten in suboptimaler Konzentration enthalten, so daß die Zugabe von tierischem

[1] Jetzt: University of Buffalo. Buffalo N. Y., USA.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

kristallinem Zytochrom c eine deutliche Steigerung der Sauerstoffaufnahme herbeiführt. Dasselbe ist auch der Fall, wenn, wie Goddard (5) gezeigt hat, pflanzliches Zytochrom c, gewonnen aus Weizenembryos, zu Weizenembryopräparaten zugesetzt wird. Tatsächlich wurden, unabhängig davon, ob das Zytochromoxydasepräparat pflanzlicher oder tierischer Herkunft war, in jedem Falle höhere Werte für die Zunahme der Sauerstoffaufnahme erzielt, wenn tierisches (Herz-) Zytochrom c verwendet wurde. Wegen der Einfachheit der experimentellen Ausführung ist dies die allgemein akzeptierte Methode des tentativen Nachweises des Zytochromsystems.

Goddard (5) gelang 1944 die Isolierung eines hochgereinigten Präparates von Zytochrom c aus Weizenembryos. Durch diese Forschungsergebnisse wird der Eindruck erweckt, daß das Zytochromsystem dasjenige Atmungsenzymsystem darstellt, welches verantwortlich ist für die gesamte Sauerstoffaufnahme der betreffenden Pflanzen. Dies um so mehr, als es J. Bonner (2) nicht gelang, eine Polyphenoloxydase in Avena-Koleoptilen nachzuweisen. Anderseits zeigen viele Arbeiten einen hemmenden Einfluß einer sauerstoffarmen Atmosphäre auf das Wachstum, die Atmung und die Salzaufnahme der verschiedensten Pflanzen (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Von besonderem Interesse, weil Avena als Versuchsmaterial diente, sind die Beobachtungen von Thimann und W. D. Bonner jr. (13, 14) und von Showacre und du Buy (15). Segmente von Avena-Koleoptilen ohne zusätzlichen Auxinzusatz zeigen, wenn zur Gänze von Wasser bedeckt, stärkeres Wachstum, während im Falle von Auxinzusatz bei Segmenten, welche gerade die Wasseroberfläche durchbrechen, eine wesentlich größere Längenzunahme zu verzeichnen ist. Wenn Auxin in dieser Arbeit erwähnt wird, ist immer β-Indolessigsäure („Heteroauxin") verstanden, da dieses von der Mehrzahl der Arbeiter auf diesem Gebiet als das hauptsächliche natürliche Wachstumshormon angesehen wird.

Wenngleich diese Ergebnisse nicht quantitativ in bezug auf den Sauerstoffpartialdruck waren, so weisen sie doch auf einen direkten Einfluß des Sauerstoffdruckes auf das Wachstum der Avena-Koleoptile hin. Diese Ansicht wird weiterhin bestärkt, wenn wir die Ähnlichkeit im Verhalten gegenüber wechselndem Sauerstoffpartialdruck von Maisembryos betrachten, deren Atmung und Wachstum, letzteres auf einer Frischgewichtsbasis, als äußerst sensitiv gegenüber Sauerstoffdruck gefunden wurde (Vlamis und Davis [16]). Diese und andere Berichte (es wurde hier kein Versuch unternommen, eine komplette Literaturübersicht zu

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

geben) weisen klar darauf hin, daß im Falle des Avena-Keimlings eine Relation zwischen Sauerstoffdruck, Atmung und Wachstum gefunden wird.

Nun steht aber eine Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffdruck in Widerspruch mit der Ansicht, daß das Zytochromsystem das einzig verantwortliche Endglied im Oxydationsvorgang darstellt. Winzler (17, 18), der mit aus Hefe gewonnenen Zytochromoxydasepräparaten arbeitete, konnte zeigen, daß dieses Enzymsystem sich gegenüber Sauerstoffpartialdruck höchst insensitiv verhält. Von Brown und Goddard (3) stammen die einzigen experimentellen Angaben, die mit einem Zytochromoxydasepräparat von höheren Pflanzen erzielt wurden. In diesem Falle war eine Kontrollbestimmung für Kohlenmonoxydhemmung ausgeführt worden, und das Enzym zeigte in 5% O_2 und 95% N_2 nur eine geringfügig niedrigere Sauerstoffaufnahme als in 21% Sauerstoff (Luft). Als Arbeitshypothese wurde die Ansicht vorgebracht, daß: erstens Atmung wie Wachstum der Avena-Keimlinge vom Sauerstoffdruck abhängig sind; zweitens, daß Oxydasesysteme gefunden werden, welche sich in ähnlicher Weise als vom Sauerstoffdruck abhängig erweisen; drittens, daß auf Grund weiterer Versuche der Hinweis auf eine direkte Relation zwischen Wachstum und einem derartigen Oxydationssystem gefunden werden kann. Dies letztere sollte mit Hilfe von Verbindungen, welche eine gewisse Spezifizität als Hemmstoffe von Oxydasesystemen besitzen, erreicht werden. Um die Sauerstoffdruckabhängigkeit von Schwermetall-Oxydasesystemen festzustellen, wurden teilweise gereinigte Präparate von Askorbinsäureoxydase und Polyphenoloxydase als auch Zytochromoxydase aus Pflanzenmaterial hergestellt und dieselben getestet. Die Sauerstoffdruckempfindlichkeit der Flavoproteinoxydase von Warburg, des „old yellow enzymes“, war bereits von Prof. Warburg festgestellt worden (19).

Experimentelles.

Samen von *Avena sativa*[1] wurden entspelzt, für 2 Stunden quellen gelassen und dann auf feuchtem Filtrierpapier zum Keimen ausgelegt. Die Keimlinge wuchsen in geschlossenen Petrischalen, also in praktisch saturierter Luftfeuchtigkeit; sie wurden für kurze Zeiten etwas rotem Licht ausgesetzt und auf einer Temperatur von 25° C gehalten. Für Hemmstoffexperimente

[1] Das MacDonald-College of Agriculture stellte freundlicherweise den in dieser Arbeit verwendeten Hafer zur Verfügung. Die Bezeichnung war: Avena sativa var. „Banner 44“.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

wurden die Keimlinge in Petrischalen auf 2% Agar, welches die im einzelnen Falle angegebene Hemmstoffkonzentration enthielt, wachsen gelassen. Als Wachstumsindex wurde die Länge, auf halbe Millimeter aufgerundet, verwendet. Für Gasmischungen wurde Luft und normaler Tanksauerstoff verwendet. Tankstickstoff wurde von Spuren Sauerstoff in einem Verbrennungsrohr über reduziertem Kupferdraht bei ungefähr 420° C befreit. Resultate von Experimenten mit ungereinigtem Tankstickstoff stimmten mit solchen, die nach Reinigung des Stickstoffes erhalten wurden, überein. Kein Anhalt, der auf Gegenwart giftiger flüchtiger Kupferverbindungen hätte schließen lassen, wurde gefunden. In Wachstumsexperimenten unter verschiedenartigem Sauerstoffpartialdruck wurden 12 Samen in hermetisch abgeschlossene, 123 ccm fassende Erlenmeyerkolben auf befeuchtetes Filtrierpapier ausgesetzt. Jeder Kolben enthielt ein gleiches Volumen Wasser. Die Gasmischung wurde zweimal täglich erneuert. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck fällt der Sauerstoffverbrauch stark ab. Dadurch fluktuierte die tatsächliche Sauerstoffkonzentration nur wenig, und der Wert der Resultate wurde nicht beeinträchtigt. Sowohl Atmungsmessungen als auch Aktivitätsbestimmungen der isolierten Oxydasesysteme wurden in einem konventionellen Warburg-Apparat ausgeführt. Für die Hemmstoffexperimente wurde im Falle intakten Gewebes dasselbe vor der Sauerstoffaufnahmebestimmung mehrere Stunden mit der Hemmstofflösung in Kontakt gebracht. Es zeigte sich in Vorversuchen, daß eine hinreichende Hemmstoffaufnahme, also Equilibrium, erzielt wurde, wenn Koleoptilen oder Koleoptilsegmente 2 Stunden und wenn Blätter oder Segmente 4 Stunden auf den einzelnen Hemmstofflösungen schwammen. Diesen Lösungen wurden außerdem 2% Zucker zugesetzt, um einem Aushungern der Gewebe vorzubeugen. Dieselben Lösungen wurden anschließend in den Warburg-Gefäßen verwendet. Nachdem gefunden wurde, daß man höhere Werte für die Sauerstoffaufnahme erhielt, wenn die Gewebesegmente bloß mit den betreffenden Lösungen befeuchtet waren, wurden die Gewebesegmente in den Warburg-Gefäßen nicht schwimmen gelassen, sondern nur befeuchtet. Eine Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit von 160 auf 200 Oszillationen pro Minute hatte nur einen minimalen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme. In einigen Experimenten wurden dieselben Gewebesegmente nacheinander verschiedenem Sauerstoffdruck ausgesetzt. Diese so erhaltenen Resultate stimmten überein mit Werten, welche in Experimenten erhalten wurden, bei denen eine äquivalente Segmentanzahl jeweils bei verschiedenem Sauerstoffpartialdruck gleichzeitig geprüft wurde.

Homogenisierte Präparate wurden in folgender Weise bereitet: Das auf 0° C abgekühlte Pflanzenmaterial wurde in einem gleich kaltem Mörser feinst verrieben und der so erhaltene Brei auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Diese an sich primitive Methode erwies sich als schonender als die Verwendung von schnell rotierenden Messern, wie sie in Homogenisierapparaten verwendet werden. Zellwandmaterial wurde zunächst vom rohen Homogenpräparat durch Zentrifugierung bei niedriger Umdrehungszahl abgetrennt. Dieses erste Sediment wurde zweimal in eiskaltem, destilliertem, schwermetallfreiem Wasser resuspendiert, rezentrifugiert und schließlich in Phosphatpuffer von angezeigtem p_H-Wert suspendiert. Mitochondria wurden erhalten durch Differentialzentrifugierung des rohen Homogenpräparates, nachdem das Zellwandmaterial durch Filtration durch Glaswolle entfernt worden war. Zellkerne wurden bei mittlerer Geschwindigkeit auszentrifugiert und die so erhaltene Suspension vom auszentrifugierten Zellkernkuchen mittels einer Absaugvorrichtung vorsichtig entfernt. Diese überstehende Suspension wurde nunmehr in einer Servall-Winkelzentrifuge einer Zentrifugalkraft von 18.000 g (das 18.000fache der Erdanziehung) für 20 Minuten ausgesetzt. Das Sediment nach dieser Zentrifugierung wurde in einer Lösung von 0,4 Mol Saccharose, 0,2 Mol Phosphat und 0,001 Mol Magnesiumsulfat suspendiert und diese Suspension neuerlich derselben Zentrifugierung ausgesetzt. Auf diese Weise wurde eine weitgehende Waschung der „Partikelchen" erzielt, ohne eine allzugroße Schädigung der partikelgebundenen Enzymsysteme herbeizuführen. Die Zusammensetzung der Suspensionslösung ist basiert auf der Arbeit von A. Millerd (20). Das neue Sediment wurde wieder in derselben Lösung suspendiert und als Mitochondriafraktion bezeichnet. Jedes der erhaltenen Präparate wurde einer mikroskopischen Prüfung unterzogen, um die Möglichkeit wechselseitiger Verunreinigung von Zellkernmaterial durch die Mitochondriafraktion und umgekehrt auszuschließen.

Die mikroskopische Untersuchung der Mitochondriafraktion zeigte kugelförmige Körper mit einem Durchmesser von ungefähr 0,5 bis 4 μ und stäbchenförmige Strukturen von etwa 0,2 μ Breite und bis zu 6 μ Länge. Noch kleinere, wohl gleichfalls runde Körper von weniger als 1 μ Durchmesser waren gleichfalls vorhanden. Es wurde kein Versuch unternommen, diese „Mikrosome" von den „Mitochondria" abzutrennen. Die zu einem Kuchen zusammengepackte Mitochondriamasse färbt sich gut mit Janusgrün B. Unter dem Mikroskop war die Färbung wegen der Lichtrefraktion nur mit Schwierigkeit zu beobachten. Derartige Färbungsschwierigkeiten sind im Detail von H. Stafford (21) besprochen worden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die nach der ersten oben erwähnten Zentrifugierung unter 18.000 g anfallende überstehende Flüssigkeit wurde als Zytoplasmafraktion bezeichnet. Sie stellt immer noch keine echte Lösung dar, ist doch mikroskopisch eine geringe Anzahl von Mikrosomen festzustellen. Abschließend ist noch zu bemerken, daß alle Zentrifugierungen bei einer Temperatur zwischen 0° und 3° C durchgeführt wurden.

Askorbinsäureoxydase wurde aus *Pisum sativum* var. Kelvedon wonder gewonnen. Wurzeln und Sprosse von etwa 150 fünf Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen wurden auf 0° C abgekühlt, in Wasser homogenisiert und der erhaltene Brei zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50% Ammoniumsulfatlösung aufgenommen und über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Nunmehr wurde diese Suspension wieder zentrifugiert, das ziemlich trockene Sediment mit eiskaltem Wasser extrahiert und neuerlich zentrifugiert. Die Ammoniumsulfatlösung befreite die Askorbinsäureoxydase, welche vom Zellwandmaterial adsorbiert war. Die nach der Zentrifugierung des wäßrigen Extraktes erhaltene überstehende Lösung stellt das Präparat dar, welches im folgenden als gereinigte Askorbinsäureoxydase bezeichnet wird.

Diese so bereitete Enzymlösung erhielt ihre Aktivität für mindestens eine Woche, wenn sie bei 4° C aufbewahrt wurde. Präparate wurden auch in analoger Weise von den ersten Blättern der Avena-Keimlinge hergestellt. Für die Aktivitätsbestimmung wurde ein 0,2 molarer Phosphatpuffer von p_H 5,8 verwendet. Wenngleich im Falle des gereinigten Präparates praktisch keine Autooxydation beobachtet wurde, und dies selbst in reiner Sauerstoffatmosphäre, so wurde als Sicherheitsmaßnahme dennoch stets eine Kontrolle von durch Hitze denaturiertem Enzym eingeschaltet.

Minimalmengen von Sauerstoffaufnahme in diesen Kontrollen wurden von den Sauerstoffaufnahmen der enzymatisch katalysierten Reaktion in Abzug gebracht. Dieser Arbeitsvorgang wurde nicht nur für alle Askorbinsäureoxydasepräparate, sondern für alle Oxydasen verwendet, besonders da Hydrochinon und p-Phenylendiamin eine ganz beträchtliche Autooxydationsgeschwindigkeit aufweisen.

Als zweite Vorsichtsmaßregel wurden stets Kontrollen für endogene Atmung mitlaufen gelassen. Es wird angenommen, daß alle in der Folge gegebenen Werte die wirkliche Sauerstoffaufnahme des jeweiligen Oxydasesystems darstellen und alle Fehlerquellen ausgeschlossen wurden.

Polyphenoloxydase wurde aus geschälten Kartoffeln hergestellt. Die in absolutem Alkohol unlösliche Fraktion wurde nach

der Abtrennung in dest. schwermetallfreiem Wasser aufgenommen. Unlösliche Eiweißkörper wurden durch Zentrifugierung oder Filtration entfernt und die klare Lösung verwendet. Für die manometrischen Messungen wurde 0,2 molarer Na-K-Phosphatpuffer von p_H 7,0 verwendet.

In Experimenten mit dem Zytochromsystem wurde ein Mitochondriapräparat verwendet, das nach dem eben erwähnten Herstellungsgang erhalten wurde. In einigen Fällen, es wird darauf besonders hingewiesen werden, wurde das rohe Homogenpräparat verwendet. In diesen Experimenten, wo es darauf ankam, die relative spezifische Aktivität festzustellen, mußte die Reinheit des Präparates natürlich der Erhaltung der ursprünglichen Aktivität den Vorrang geben. p-Phenylendiamin wurde als Substrat verwendet und das Inkrement der Sauerstoffzunahme nach Zusatz von Zytochrom c als relativer Wert der spezifischen Aktivität verwendet. Dieses Verfahren hat den zusätzlichen Vorteil, daß in einem derartigen Rohhomogenpräparat der Großteil des ursprünglich gebundenen Zytochrom c von den Mitochondria abgespalten wird und dadurch die Konzentration an der Mitochondriaoberfläche derart sinkt, daß das Zytochrom c nicht mehr als Elektronenüberträger zur Geltung kommt. Wird in dieser Suspension durch Zusatz einer Lösung von kristallisiertem Zytochrom c die Konzentration an der Mitochondriaoberfläche auf die ursprüngliche Höhe gebracht, so erfolgt maximale Reaktivierung. Die manometrische Aktivitätsbestimmung im Warburg-Apparat wurde bei p_H 7,4 durchgeführt. Alle in den Tabellen gegebenen Werte wurden auf Grund der Resultate von mindestens 3 bis 5 Experimenten ermittelt.

Resultate.

Als Grundlage für diese Arbeit wurde die Sensitivität von isolierten und teilweise gereinigten Oxydasesystemen gegenüber Sauerstoffpartialdruck untersucht. Es wurde gefunden, daß sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen alle untersuchten Systeme, mit einer einzigen Ausnahme, als äußerst abhängig vom Sauerstoffdruck erweisen. Das einzige System von diesbezüglich verschiedenem Verhalten ist das Zytochromsystem. Abb. 1 gibt Werte für drei Oxydasesysteme. V/Max (die maximale Reaktionsgeschwindigkeit) ist aufgetragen auf der Ordinate gegen Prozent Sauerstoff des verwendeten Gemisches auf der Abszisse. In einer Atmosphäre von 2% Sauerstoff und 98% Stickstoff arbeitet das Zytochromsystem bereits mit voller Kapazität (Kurve 1). Kurve 2 zeigt das

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Ansteigen der Sauerstoffaufnahme in der Zeiteinheit mit ansteigendem Sauerstoffpartialdruck für das Polyphenoloxydasesystem. Kurve 3 illustriert die ähnliche Sensitivität gegenüber Sauerstoffdruck für die gereinigte Askorbinsäureoxydase.

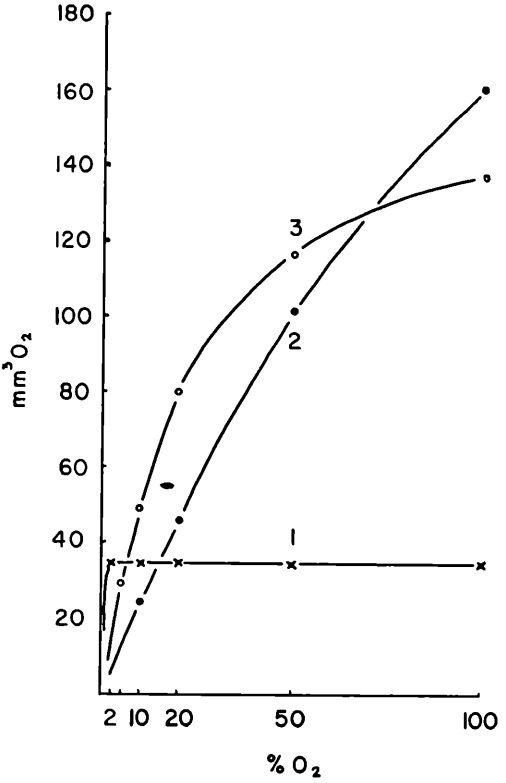

Abb. 1. Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes auf Enzymaktivität. V/max für: x Zytochromsystem, ● Polyphenoloxydase, o Askorbinsäureoxydase.

Nachdem dieses fundamental gegensätzliche Verhalten festgestellt worden war, war der nächste Schritt, den Einfluß von wechselndem Sauerstoffpartialdruck auf die endogene Atmung des Avena-Keimlings zu studieren. Auf Grund des bekannten Wechsels im metabolischen System des Avena-Keimlings im Alter von etwa 72 Stunden wurden Koleoptilen, Blätter und Wurzeln von Keim-

lingen aller Altersstufen untersucht. Abb. 2 zeigt den Betrag der Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck. In Kurve 1 ist die Sauerstoffaufnahme pro Stunde von 10 Koleoptilen von 120 Stunden alten Keimlingen gegen Prozent Sauerstoff der verwendeten Atmosphäre aufgetragen. Kurve 2 gibt die analogen

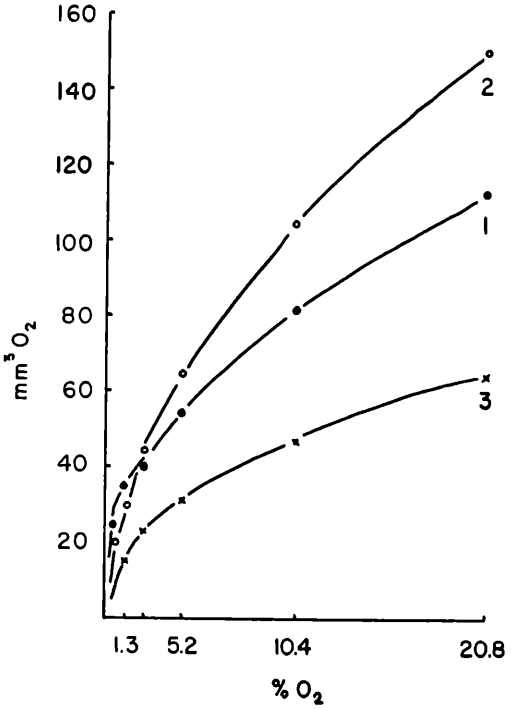

Abb. 2. Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes auf die endogen-exogene Atmung. ● Q_{O_2} für zehn 120 Stunden alte Koleoptilen, o Q_{O_2} für zehn 120 Stunden alte erste Blätter, x Q_{O_2} für achtzig 30 Stunden alte Wurzelsysteme respektive oberirdische Sprosse.
Alle Gefäße enthielten 0,5 ccm einer einprozentigen Saccharoselösung.

Werte für die Blätter. Kurve 3 demonstriert die Abhängigkeit der endogenen Atmung der Wurzeln und oberirdischen Sprosse von je 80 30 Stunden alten Keimlingen vom Sauerstoffpartialdruck. Es ist interessant, daß in diesem frühen Stadium des Wachstums die oberirdischen Teile anscheinend eine ganz genau so große Sauerstoffaufnahme haben wie die unterirdischen Wurzeln. In Experimenten mit Koleoptilen, Blättern und Wurzeln jeder Altersgruppe

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

bis zu 150 Stunden fand sich stets eine hohe Empfindlichkeit der endogenen Atmung gegenüber steigendem Sauerstoffpartialdruck (bis zu 100% Sauerstoff).

Um weitergehende Informationen über die Natur des (der) verantwortlichen Oxydasesystems(e) zu erhalten, wurde die Wirkung von Schwermetallgiften auf die endogene Atmung von Koleoptilen und Blättern untersucht. Eine solche Versuchsanordnung sollte auch einen gewissen Aufschluß über den relativen Anteil der einzelnen Systemgruppen an der endogenen Atmung bringen. Wenngleich zur Zeit keine Verbindung bekannt ist, welche ein Eisenenzym, wie z. B. das Zytochromsystem, vollständig inaktiviert, ohne ein Kupferenzym, wie z. B. die Polyphenoloxydase, gleichzeitig bis zu einem gewissen Grade zu hemmen und vice versa, so haben wir doch eine relative Selektivität (22). Die Hemmung derartiger Schwermetallenzyme besteht ja meistens darin, daß gewisse Verbindungen mit Schwermetallen Komplexe bilden, somit Eisen oder Kupfer aus dem natürlichen Enzymgefüge herausnehmen; in einigen Fällen finden wir auch eine direkte Anlagerung, wodurch vorher freie Elektronenpaare abgesättigt werden. In Vorversuchen wurde gefunden, daß Natriumazid (NaN_3) in einer Konzentration von 10^{-3} Mol das Zytochromsystem vollständig hemmt, während Askorbinsäureoxydase noch 66% seiner vollen Aktivität aufweist. Vorwiegend Kupfergifte, wie z. B. 8-Oxychinolin und Salicylaldoxim, bewirkten in einer Konzentration von 5×10^{-3} Mol eine 100prozentige Hemmung der Askorbinsäureoxydase und nur eine 45prozentige Inaktivierung des Zytochromsystems. Auf Grund dieser Beobachtung wurden die drei oben erwähnten Verbindungen in diesen Konzentrationsbereichen verwendet und ihr Einfluß auf die endogene Atmung studiert.

In diesem Zusammenhang muß kurz auf zwei Möglichkeiten eingegangen werden. Erstens muß die Konzentration in einem lebenden Gewebe durchaus nicht die gleiche sein, wie in der mit dem Gewebe in Kontakt stehenden Lösung. Auf Grund der Tatsache, daß die Hemmung der endogenen Atmung und die der gereinigten Oxydasesysteme in denselben Hemmstoffkonz.-Bereich fällt, kann angenommen werden, daß die Verhältnisse, wenn auch nicht identisch, so doch sehr ähnlich liegen, eine Verallgemeinerung demnach zulässig ist. Die zweite Einschränkung, die bedacht werden muß, ist die Möglichkeit, daß außer den Oxydasesystemen andere Enzymsysteme von den Hemmstoffen beeinflußt werden könnten. Wenn z. B. die in dieser Arbeit verwendeten Hemmstoffe Dehydrogenasen oder andere wasserstofftransportierende Systeme beeinflussen würden, dann wäre es genau so denkbar, daß die

physiologische Rolle, die hier einer Metalloxydase zugeschrieben wird, dem schwermetallfreien „Gelben Enzym“ zufällt. Darüber hinaus wäre es theoretisch möglich, daß die Hemmung an einer Stelle der Reaktionsfolge einsetzt, die vor der Oxydasereaktion gelagert ist, vorausgesetzt, daß diese Reaktion und die damit verbundenen Enzyme in großem Überschuß vorhanden sind. Um diese zweite Möglichkeit gleichfalls tunlichst auszuschließen, wurde eine Reihe von verschiedenartigen Hemmstoffen verwendet. Außer den in den Tabellen genannten wurden Versuche mit Phenylthiocarbamid und Diaethyldithiocarbamat ausgeführt. Diese vier Verbindungen sind in ihrer chemischen Struktur äußerst verschieden und haben, soweit bekannt, nur eines gemein: eine Tendenz, speziell mit Kupfersalzen Komplexe zu formen. Alle vier Verbindungen zeigten ähnliche Hemmwirkung. Wenngleich auf diese zweite mögliche Einschränkung hingewiesen werden muß, so ist doch die Wahrscheinlichkeit einer Fehlinterpretation äußerst gering.

Tabelle 1. Endogene Atmungshemmung.

Avena, Alter der Blätter in Stunden	Hemmung in Prozent von							
	8-Oxychinolin		Salicylaldoxim		Natriumazid		Natriumazid 10^{-3} M + 8-Oxychinolin 5×10^{-3} M	Natriumazid 10^{-3} M + Salicylaldoxim 5×10^{-3} M
	3×10^{-3} M	5×10^{-3} M	3×10^{-3} M	5×10^{-3} M	10^{-3} M	2×10^{-3} M		
60	38	64	30	63	51	72	100	100
80	38	58	—	56	58	—	96	96
100	—	55	38	58	60	—	100	96
120	—	50	—	57	68	81	98	98

Hemmungswerte wurden erhalten von Experimenten von 45 bis 60 Minuten Dauer. Während dieser Periode hatten Kontrollen eine Sauerstoffaufnahme von 80 bis 100 μl.

Resultate der Hemmstoffexperimente mit Blättern sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Blätter von 60, 80, 100 und 120 Stunden alten Keimlingen wurden verwendet. Jede der Verbindungen erbrachte, wenn sie in der angegebenen Konzentration für sich allein verwendet wurde, eine Hemmung der endogenen Atmung von etwa 50%. Dieser Wert bleibt ungefähr gleich, unabhängig davon, ob ein

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

mehr spezifischer Eisen- oder Kupferkomplexbildner verwendet wurde. Mit zunehmendem Alter der Blätter stellt sich möglicherweise eine leichte Zunahme der Sensitivität gegenüber Natriumazid ein. Die kombinierte Verwendung von Kupfer und Eisenkomplexbildnern ergibt praktisch vollständige Unterdrückung der endogenen Atmung. Zu bemerken ist in diesem Zusammenhang, daß auch in diesen Experimenten die Blätter nach Beendigung der Versuche voll turgeszent waren, ohne irgendwelche Anzeichen von Verwelkungserscheinungen.

Experimente, die mit Koleoptilen der gleichen Altersgruppen ausgeführt wurden, ergaben prinzipiell gleichartige Resultate. Die Atmungshemmung durch die Einwirkung eines einzelnen Hemmstoffes ergab jeweils etwas höhere Werte. Kombinierte Verwendung ergab wiederum vollständige Hemmung. Die naheliegendste Auslegung dieser Resultate wäre, eine Beteiligung in etwa gleicher Größenordnung für mindestens je ein kupfer- und ein eisenhaltiges Oxydationssystem an der endogenen Atmung anzunehmen. Darüber hinaus wurde aber kein Anzeichen für die Teilnahme einer Nichtmetalloxydase an der endogenen Atmung gefunden (vollständiger Atmungsstillstand durch die kombinierte Verwendung von Eisen- und Kupfergiften).

Als nächster Schritt erschien es nunmehr notwendig, die Identität der vorhandenen Oxydasesysteme eindeutig klarzustellen. Gleichzeitig wurde versucht, die intrazelluläre Lokalisation dieser Enzymsysteme nachzuweisen. Die Identifizierung erfolgte durch Oxydation spezifischer Substrate bei spezifischen p_H-Werten. Als zusätzliche Rückversicherung wurde die Sensitivität gegenüber Hemmstoffen überprüft. Die Resultate sind in Tabelle 2 in komprimierter Form vereinigt. Als gefunden wurde, daß Askorbinsäureoxydase hauptsächlich an Zellwandmaterial gebunden auftritt, wurde die intrazelluläre Verteilung der relativen spezifischen Aktivität für Koleoptilen, Blätter und Wurzeln untersucht. Es wurde vermutet, daß ein Enzymsystem, das am Zellwandmaterial adsorbiert auftritt, wohl eine direkte Beziehung zum Wachstum desselben hat, und dies vielleicht mehr als ein System, das nur in der Mitochondriafraktion angetroffen wird. Selbst nach zwei aufeinanderfolgenden Waschungen war der adsorbiert gebliebene Anteil der Askorbinsäureoxydase noch außergewöhnlich hoch. Katalase und Peroxydase wurden in der Zytoplasmafraktion gefunden und waren in jeder Altersstufe vorhanden. Peroxydase hatte dieselben Rf-Werte in Papierchromatogrammen wie ein Peroxydasepräparat aus der Wurzel von *Armoracia rusticana* nach Entwicklung mit 0,1 Mol Zitratlösung oder 0,1 Mol Saccharose. Ein analog

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ähnliches Verhalten zeigte Katalase im Vergleich zu einem Katalasepräparat von der Firma Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio. Es wurde auch einiges Beweismaterial erhalten, das auf das Vorkommen einer spezifischen TPNH-Oxydase (Hydrotriphosphopyridinnukleotidoxydase) im Zytoplasma hinweist.

Tabelle 2. Intrazelluläre Verteilung der Oxydasen.

Askorbinsäureoxydase	An Zellwand adsorbiert Prozent	Löslicher Anteil Prozent
Koleoptile	68	31
Blatt	80	14
Wurzeln	90	9

Katalase	Zytoplasma-Fraktion
Zytochrom System	Mitochondria-Fraktion
Peroxydase	Zytoplasma-Fraktion
TPNH-Oxydase	Zytoplasma-Fraktion
Polyphenoloxydase	Nil

Ein derartiges oder ähnliches System ist bereits von Vennesland und Mitarbeitern (23) beschrieben worden. Die Oxydation von reduziertem Diphosphopyridinnukleotid konnte mit dem Beckmann-Spektrophotometer verfolgt und eine beträchtliche Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden (Abb. 3). Hierbei ist zu beachten, daß reduziertes Diphosphopyridinnukleotid verwendet worden war, welches in Venneslands Versuchen nur ein Viertel der Reaktionsgeschwindigkeit von Triphosphopyridinnukleotid aufwies.

Das Zytochromsystem schien vollständig auf die Mitochondriafraktion beschränkt. Wurde das Präparat vom Anfang an mit einer Lösung 0,4 Mol Saccharose, 0,2 Mol Phosphat und 0,001 Mol $MgSO_4$ bereitet, so wurde manchmal keine Aktivierung bei Zusatz von Zytochrom c beobachtet. In Abwesenheit von Saccharose war Zytochrom c anscheinend herausgelöst und bei Zusatz verblieb es aktiv. Wurden hingegen mit Saccharose angefertigte Präparate im Kühlschrank einige Zeit aufbewahrt, so zeigte sich auch hier Zytochrom c als wirksam.

Es wurde kein Hinweis für das Vorkommen von Polyphenoloxydase gefunden. Somit wäre der Anteil der endogenen Atmung, welcher sich in den eingangs besprochenen Hemmstoffexperimenten

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

als von Kupferenzymsystemen katalysiert erschien, auf Askorbinsäureoxydase und TPNH-Oxydase aufzuteilen. Für das letztere System ist die Kupfernatur zwar nicht analytisch erwiesen, doch sprechen Vennesländs Experimente dafür, daß dieses System aus einem Peroxydase- und einem Kupferoxydaseanteil zusammen-

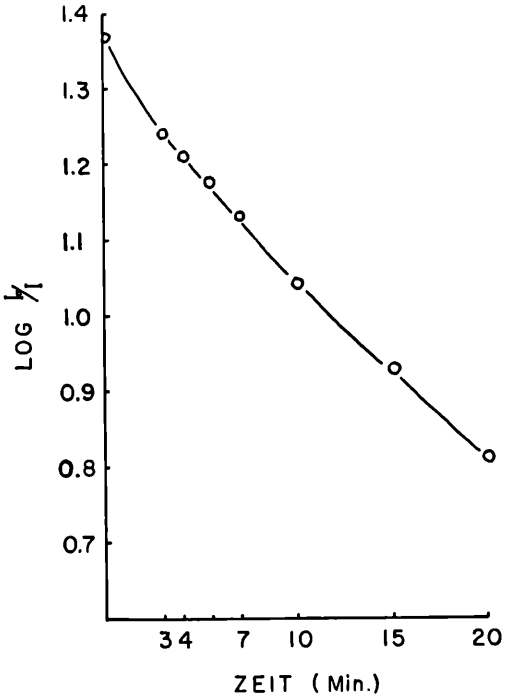

Abb. 3. Enzymatische Oxydation von reduziertem Diphosphopyridinnukleotid. System: 1 ccm Zytoplasmafraktion von 150 Stunden alten Koleoptilen, 1 ccm Phosphatpuffer von p_H 7,4, $\pm$0,2 ccm DPNH. Verwendete Wellenlänge: 340 mμ.

gesetzt ist (23). Die Kupferkomplexbildner, wie Diaethyldithiocarbamat und Phenylthiocarbamid, hemmen bereits in niedrigen Konzentrationen. Andererseits deutet die Hemmung dieses Enzymsystems durch Katalase — eine Katalasekonzentration von 2×10^{-8} Mol ergab je nach Präparat eine 75- bis 100prozentige Hemmung — auf eine intermediäre Bildung von Wasserstoffperoxyd hin. Eine partielle Atmungshemmung durch Katalase wurde auch in Koleoptilhomogenpräparaten gefunden.

Um die physiologische Bedeutung obiger Ergebnisse auszuwerten, wurde eine spezifische Verbindung zwischen irgendeiner der Oxydasen und einem eindeutig charakterisierten physiologischen Vorgang gesucht; das Hauptinteresse in dieser Arbeit ruht auf einer Verbindung mit dem Wachstumsprozeß.

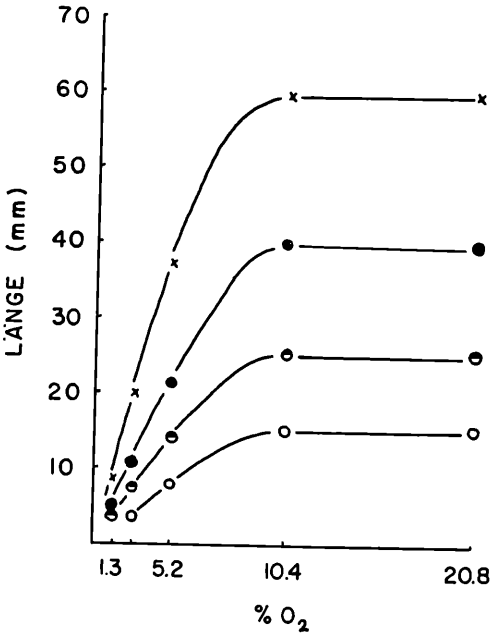

Abb. 4. Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes auf das Wachstum.
Die Keimlinge wuchsen in einer Atmosphäre von angezeigtem Sauerstoffgehalt. Länge der Koleoptilen nach: O 56 Stunden, ⊖ 72 Stunden, ● 100 Stunden x Länge der ersten Wurzeln nach 56 Stunden.

Der Zusammenhang zwischen Wachstum von Avena-Keimlingen und Sauerstoffpartialdruck ist auffallend (Abb. 4). Ansteigend bis zu einer Konzentration von 8% Sauerstoff in der Atmosphäre, findet sich eine fast lineare Relation zwischen Sauerstoffpartialdruck, ausgedrückt in Prozent Sauerstoff, und Gesamtlänge der Koleoptile, des ersten Blattes oder des Wurzelsystems. Dies ist der Fall, unabhängig davon, ob die Keimlinge bei einem Alter von 60, 80 oder 100 Stunden gemessen werden. Offensichtlich tritt bei einer höheren Sauerstoffkonzentration als 8%

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ein anderer Faktor als wachstumsbegrenzend auf. Tatsächlich erscheint bereits in Luft das Wachstum ungleichmäßiger, wenn man es mit dem in einer Atmosphäre von 10,5% Sauerstoff vergleicht. Dennoch war die Durchschnittslänge etwa die gleiche. Bei hohen Sauerstoffkonzentrationen, z. B. in einer Atmosphäre mit 50 oder 100% Sauerstoff, war das Wachstum stark zurückgeblieben. Damit war die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit des jungen Keimlings vom Sauerstoffdruck sichergestellt.

Der Wachstumsprozeß ist anscheinend auf irgendeine Weise mit einem gegenüber Sauerstoff äußerst empfindlichen Oxydasesystem verknüpft.

Nunmehr verblieb die Frage, ob das Wachstum von einem oder mehreren Oxydasesystemen abhängig ist. Der Einfluß von Hemmstoffen auf das Wachstum des Avena-Keimlings bringt eine teilweise Klarstellung. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, übt Natriumazid, der mehr spezifische Hemmstoff des Zytochromsystems, eine ununterbrochene Hemmwirkung bis zu einem Alter von 150 Stunden aus. Die mehr spezifischen Kupfergifte, wie 8-Oxychinolin und Salizylaldoxin, auch Phenylthiokarbamid und Diäthyldithiokarbamat (Werte für die letzten zwei Hemmstoffe sind nicht in der Abbildung eingezeichnet), bringen eine noch stärker betonte Hemmung des Längenwachstums zuwege.

In einer früheren Arbeit berichteten Albaum und Eichel (1), daß keine Hemmung von Natriumazid jenseits der Altersstufe von 72 Stunden stattfindet. Ein möglicher Grund für das Ausbleiben einer Hemmung in ihren Experimenten könnte darin zu finden sein, daß die Hemmstofflösung nicht, wie es in dieser Arbeit geschah, zweimal täglich ausgewechselt wurde. Als Folge wäre es denkbar, daß ein gewisser Abbau des Natriumazids stattgefunden hätte und so die Konzentration unter einen wirksamen Grenzwert abfiel. Nachdem sowohl Eisen- als auch Kupfergifte eine eindeutige Hemmung herbeiführten, kann der Schluß gezogen werden, daß sowohl ein Kupferenzym als auch ein Eisenenzym eine Rolle im Wachstumsvorgang spielen.

Nach Beendigung des experimentellen Teiles dieser Arbeit erschien die Arbeit von Hackett und Schneiderman (24), in welcher, übereinstimmend mit obigen Schlußfolgerungen, dem Zytochromsystem eine Rolle im Wachstum zugesprochen wird. Zusätzliches Beweismaterial zur Unterstützung dieses Konzeptes wurde gefunden, als die ontogenetische Verteilung der Oxydasesysteme verfolgt und mit der Wachstumskurve des Avena-Keimlings verglichen wurde.

Abbildung 6 zeigt die relative spezifische Aktivität zweier Oxydasesysteme (Kurve 1, 2 und 3), ausgedrückt als Q_{O_2} und erhalten unter optimalen Bedingungen von p_H und Temperatur für jedes Enzym, für 10 Blätter oder Koleoptilen angezeigten Alters. Für jedes Experiment wurde ein aliquoter Teil des Enzympräparates, entsprechend 10 Blättern oder 10 Koleoptilen der angeführten Altersstufe, verwendet. Die Sauerstoffaufnahme pro Stunde

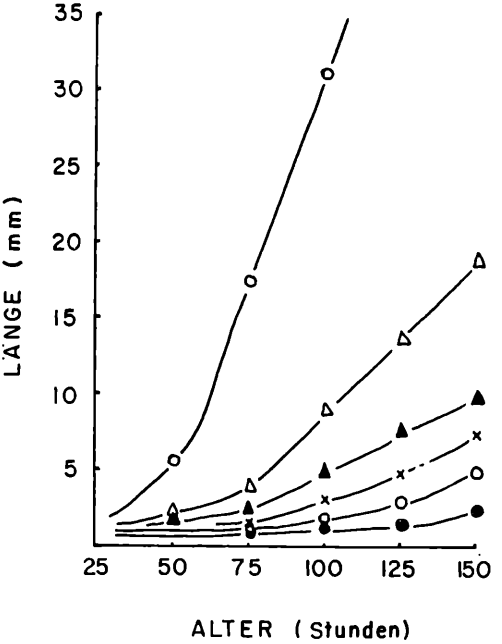

Abb. 5. Einfluß von Schwermetallgiften auf das Wachstum.
Länge der Koleoptilen bei auf der Abszisse angegebenen Zeitintervallen, wenn dieselben auf folgenden Lösungen zum Keimen ausgesetzt und wachsen gelassen wurden: O Agar ohne Zusatz, △ NaN_3 5×10^{-4} M. ▲ NaN_3 10^{-3} M, x Salicylaldoxim 3×10^{-3} M, o 8-Oxychinolin $2{,}5\times10^{-3}$ M ● Phenylthiocarbamid 3×10^{-3} M.

wurde aus Werten berechnet, die in einem Zeitintervall von mindestens 20 Minuten erhalten wurden. Die Sauerstoffaufnahme während dieses Zeitabschnittes war konstant. In Kurve 3 ist nur die zusätzliche Sauerstoffaufnahme nach Zugabe von kristallinem Zytochrom c berücksichtigt. Dadurch wurden zwar niedrigere Werte erhalten, doch spielt dies keine Rolle, da alle Werte ohne-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

dies relativ sind. Andererseits ist dadurch die Möglichkeit der Oxydation des Substrates durch andere Systeme ausgeschlossen.

Es wurde, um die Vergleichbarkeit dieser Werte sicherzustellen, kein Versuch unternommen, das Zytochrom c-Zytochrom-

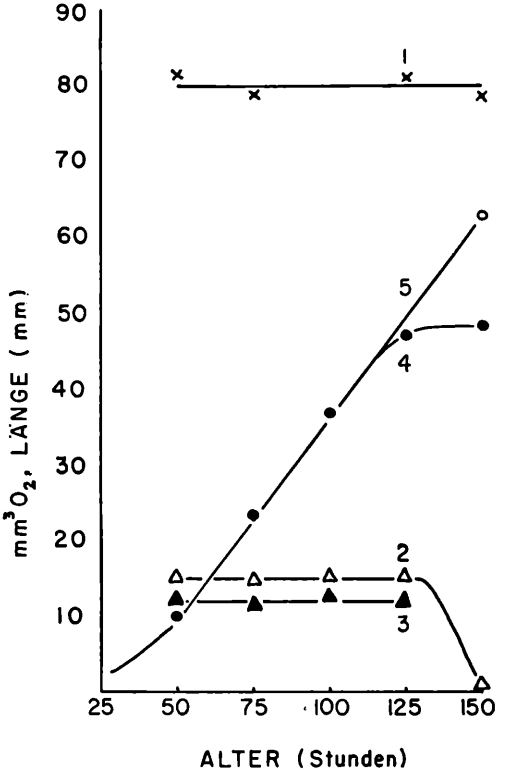

Abb. 6. Ontogenetische Verteilung der Oxydasesysteme in Vergleich zum Wachstum. Q_{O_2} von Oxydasensystemen enthalten in Rohhomogenpräparaten entsprechend 10 Blättern oder Koleoptilen.

x Askorbinsäureoxydasesystem: 1 ccm Blatthomogenpräparat, 1 ccm Phosphatpuffer 0,2 M von p_H 5,8, 0,2 ccm Askorbinsäurelösung neutralisiert zu p_H 5,8 und 2 mg Askorbinsäure enthaltend. Atmosphäre: Luft, Temperatur 20° C. Korrigiert für endogene Atmung und Autoxydation. △ Koleoptilhomogenpräparat, ansonsten wie x. ▲ Zytochrom c-Zytochromoxydase-System: 1 ccm Koleoptilhomogenpräparat in dest. Wasser, 1 ccm Phosphatpuffer 0,2 M von p_H 7,4, 0,2 ccm Zytochrom c 4×10^{-5} M, 0,2 ccm p-Phenylendiamin entsprechend 2 mg. Atmosphäre: Luft, Temperatur 20° C. Korrigiert für endogene Atmung und Autoxydation.

● Progressive Wachstumskurve für die Koleoptile.

○ Progressive Wachstumskurve für das erste Blatt.

oxydase-System oder die Askorbinsäureoxydase einer Reinigung zu unterziehen, da jede Reinigung Verluste unbekannter Größe mit sich bringt. Statt dessen werden Kontrollen für endogene Atmung und Autoxydation in den Versuchen mitlaufen gelassen und die Werte entsprechend korrigiert. Ein Rohhomogenpräparat in dest. Wasser wurde verwendet, um eine maximale Wirkung durch das zugesetzte Zytochrom c zu gewährleisten. Ein Enzymsystem, welches eine direkte Rolle im Wachstumsprozeß einnimmt, sollte erwartungsgemäß aktiv sein, solange Wachstum vor sich geht. Bei Wachstumsstillstand könnte es verschwinden oder erhalten bleiben. Die erste Alternative würde noch betonter auf eine solche direkte Rolle hinweisen. Dies ist nun tatsächlich bei der Askorbinsäureoxydase der Fall. Das Zytochrom c-Zytochromoxydase-System wie auch die Askorbinsäureoxydase scheinen sich nach erfolgter Keimung in unveränderter Menge in jedem vorgebildeten Gewebeteil, in der Koleoptile wie auch im ersten Blatt zu erhalten. Die Askorbinsäureoxydaseaktivität fällt steil ab, sobald das Wachstum zum Stillstand kommt. Die gerade Linie (Kurve 1, Abb. 6) zeigt den hohen, aber gleichmäßigen Stand der relativen Aktivität der Askorbinsäureoxydase für das erste Blatt. Kurve 2 und 3 gibt die relativen Aktivitätswerte für das Zytochrom c-Zytochromoxydase-System und für die Askorbinsäureoxydase der Koleoptile. Die Kurven 4 und 5 zeigen das fortschreitende Längenwachstum der Koleoptilen und der ersten Blätter zum Vergleich.

Diskussion.

Die in dieser Arbeit gezeigte Sensitivität von Oxydasesystemen und die Sensitivität der endogenen Atmung und des Wachstums des Avena-Keimlings gegenüber Sauerstoffpartialdruck sind ein betonter Hinweis dafür, daß ein sauerstoffempfindliches Oxydasesystem eine direkte Rolle im Wachstumsvorgang spielt. Die Verwendung teilweise selektiver Hemmstoffe in weiteren Experimenten wies auf mindestens je ein Kupferenzym und ein Eisenenzym als maßgeblich beteiligt hin. Eine mehr spezifische Versuchsordnung ließ die Gegenwart der Askorbinsäureoxydase, der Katalase, der Peroxydase und des Zytochrom c-Zytochromoxydase-Systems erkennen. Darüber hinaus wurde Beweismaterial erbracht, welches das Vorhandensein eines spezifischen TPNH-Oxydasesystems sehr wahrscheinlich macht. Es wird angenommen, daß die in vitro nachgewiesene Peroxydase in vivo einen Anteil des TPNH-Oxydasesystems darstellt, wie es von Vennesland und Mitarbeitern beschrieben wurde. Sollte dies der Fall sein, dann könnte

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

dem TPNH-Oxydasesystem eine Rolle im spezifischen Stoffwechsel zur Erhaltung der notwendigen Lebensvorgänge zugeschrieben werden, dies im Gegensatz zu den zwei anderen Oxydasesystemen (Askorbinsäureoxydase und Zytochromsystem), welche in direkter Relation zum Wachstum zu stehen scheinen. Eine gewisse Überdeckung der Funktionen wäre natürlich zusätzlich in den Bereich der Möglichkeit zu ziehen. Beweismaterial für eine direkte Relation des Zytochromsystems zum Wachstum wurde bereits von Hackett und Schneiderman geliefert (24). Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit weisen auf die Askorbinsäureoxydase als weiteres Glied im Wachstumsprozeß hin. Die Empfindlichkeit des Wachstums gegenüber Sauerstoffpartialdruck, gegenüber selektiven Kupferhemmstoffen, und der rapide Abfall der Askorbinsäureoxydaseaktivität zum Zeitpunkt des Wachstumsstillstandes unterstützen diese Auffassung. Newcomb (26) zeigte den plötzlichen Anstieg der Askorbinsäureoxydaseaktivität in Markzellen von Tabak, wenn diese durch Auxinzusatz zu Zellvergrößerung angeregt wurden. Stafford (21) fand hohe Askorbinsäureaktivität in 3 Tage alten Erbsenkeimlingen, während in 18 Stunden lang bei 4° C gequollenen Erbsen keine Aktivität nachweisbar war. Leider wurde in dieser Arbeit die Zellwandfraktion verworfen, so daß wahrscheinlich nur ein Bruchteil des tatsächlichen Wertes erfaßt wurde. Hausen (26) beschrieb den wachstumsstimulierenden Effekt von Vitamin C für verschiedene Pflanzengattungen.

Im Verlaufe der Experimente dieser Arbeit wurde außer der zumindest teilweisen Klarstellung der physiologischen Rolle der Askorbinsäureoxydase im Wachstumsprozeß noch eine weitere sehr interessante Beobachtung gemacht. Zwei Enzymsysteme, die Askorbinsäureoxydase und das Zytochrom c-Zytochromoxydase-System, zeigten gleichbleibende Aktivität während der ganzen Wachstumsperiode der Avena-Koleoptile. Mit anderen Worten, diese Enzyme werden gleichzeitig mit dem Wachstum des Gewebes dauernd verdünnt. Bei Wachstumsstillstand verschwindet die Askorbinsäureaktivität vollständig. Diese Beobachtung verleitet zu weiterer Spekulation. Es erschiene nach dem heutigen Stande unseres Wissens durchaus möglich, daß diese beiden Systeme, neben weiteren Verbindungen und Enzymen, nur während der embryonischen Wachstumsperiode gebildet oder zumindest nur dann in nennenswerten Mengen gebildet würden und daß die absolute Menge dieser Systeme das Totalwachstum, welches von den in Frage kommenden Geweben erreicht werden kann, kontrollieren würde. Ergebnisse, die von Kent und Brink (28) und von LaRue (29) mitgeteilt worden sind, unterstützen diese Anschauung.

Zusammenfassung.

Es wurde die Empfindlichkeit von Askorbinsäureoxydase und Polyphenoloxydase sowie die relative Unempfindlichkeit des Zytochromsystems höherer Pflanzen gegenüber Sauerstoffpartialdruck demonstriert.

Atmung wie Wachstum des Avena-Keimlings zeigte sich gleichfalls in hohem Maße vom Sauerstoffdruck abhängig. Natriumazid, 8-Oxychinolin, Salizylaldoxim, Phenylthiokarbamid und Diäthyldithiokarbamat bewirkten partielle Wachstums- und Atmungshemmung. Natriumazid hemmte das Wachstum wenigstens bis zu einem Alter von 150 Stunden. Die endogene Atmung wurde vollständig durch die kombinierte Anwendung von Natriumazid und einem Kupfergift gehemmt. Allein verwendet, hemmte jedes die endogene Atmung der ersten Blätter bloß zu 50—60%.

Somit wurde gezeigt, daß bei diesem Alter die Atmung zur Gänze von Metalloxydasen kontrolliert wird.

Das Vorhandensein einer spezifischen TPHN-Oxydase ist auf Grund des vorgelegten Versuchsmaterials als höchst wahrscheinlich anzunehmen.

Die ontogenetische Verteilung der Askorbinsäureoxydase und des Zytochrom c-Zytochromoxydase-Systems wurde verfolgt. Auf Grund der erhaltenen Resultate wurde der Schluß gezogen, daß Askorbinsäureoxydase eine spezifische Rolle im Wachstumsprozeß des Avena-Keimlings einnimmt.

Der Autor möchte seinen Dank Herrn Prof. Dr. K. V. Thimann, Harvard Universität, für sein freundliches Interesse und seine hilfreiche Kritik in der Interpretierung der experimentellen Ergebnisse aussprechen.

Literaturverzeichnis.

1. Albaum, H. G. und Eichel, B., The relationship between growth and metabolism in the Oat seedling. Am. J. Bot., 30, 18 (1943).
2. Bonner, J., Biochemical mechanisms in the respiration of the Avena Coleoptile. Arch. Biochem., 17, 311 (1948).
3. Brown, A. H. und Goddard, D. R., Cytochrome oxidase in wheat embryos. Am. J. Bot., 28, 319 (1941).
4. Maxwell, R. F., Cytochrome oxidase in corn embryos. Plant Phys., 25 (3), 521 (1950).
5. Goddard, D. R., Cytochrome c and Cytochrome oxidase from wheat germ. Am. J. Bot., 31, 270 (1944).
6. Wardlaw, C. E. und Allsopp, A., Experimental and analytical studies of Pteridophytes XII. The effect of different concentrations of

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

oxygen on inactive and active Meristems of Fern. Ann. Bot., N. S., 12, 157 (1948).

7. Tang, P., On the rate of oxygen consumption by tissues and lower organisms as a function of oxygen tension. Quart. Rev. Biol., 8, 260 (1934).
8. Hopkins, H. T., Specht, A. W. und Hendricks, S. B., Growth and nutrient accumulation as controlled by oxygen supply to plant roots. Plant Phys., 25 (2), 193 (1950).
9. Platenius, H., Effect of oxygen concentration on the respiration of some vegetables. Plant Phys., 18 (4), 671 (1943).
10. Steward, F. C., Berry, W. E. und Broyer, T. C., The absorption and accumulation of solutes by living plant cells VIII. The effect of oxygen upon respiration and salt accumulation. Ann. Bot., 50, 345 (1936).
11. Chang, H. T. und Loomis, W. E., Influence of oxygen tension on the absorption of water, nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium. Plant Phys., 20, 221 (1945).
12. Lawton, K., Influence of oxygen tension upon ion adsorption. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 10, 263 (1945).
13. Thimann, K. V. und Bonner, W. D. Jr., Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. I. The action of Iodoacetate and organic acids on the Avena Coleoptile. Am. J. Bot., 35, 271 (1948).
14. — Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. II. The action of several enzyme inhibitors on the growth of the Avena Coleoptile and on Pisum internodes. Am. J. Bot., 36, 214 (1949).
15. Showacre, J. L. und du Buy, H. G., The relation of water availability and auxin in the growth of Avena Coleoptiles and its meaning for a theory of tropisms. Am. J. Bot., 34, 175 (1947).
16. Vlamis, J. und Davis, A. R., Germination, growth and respiration of rice and barley seedlings at low oxygen pressures. Plant Phys., 18, 685 (1943).
17. Winzler, R. J., The respiration of bakers yeast at low oxygen tension. J. Cell. Comp. Phys., 17, 263 (1941).
18. — A comparative study of the effects of cyanide, azide, and carbon monoxide on the respiration of bakers yeast. J. Cell. Comp. Phys., 21, 229 (1943).
19. Warburg, O., Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung. Biochem. Z., 189, 354 (1927).
20. Millerd, A., Bonner, J., Axelrod, B. und Bandurski, R., Oxidative and phosphorylative activity of plant mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci., 37 (12), 855 (1951).
21. Stafford, H. A., Intracellular Localisation of enzymes in pea seedlings. Phys. Plant. vol. 4, 696 (1951).
22. James, W. O. und Garton, N., The use of sodium diethyldithiocarbamate as a respiratory inhibitor. J. Exp. Bot., 3, 310 (1952).
23. Conn, E. E., Kraemer, L. M., Pei-Nam und Vennesland, B., The aerobic oxidation of reduced Triphosphopyridin Nucleotide by a wheat germ enzyme system. J. Biol. Chem., 194, 143 (1952).
24. Hackett, D. P. und Schneiderman, H. A., Arch. of Biochem., in Druck.

25. Newcomb, E. H., Effect of auxin on Ascorbic oxidase activity in tobacco pith cells. Proc. Soc., Exptl. Biol. & Med., 76, 504 (1951).
26. Stafford, H. A., The distribution and development of encymes in pea seedlings. Bull. of the Torrey Bot. Club, No. 5, 351 (1952).
27. Hausen, S. v., The role of vitamin c in the growth of higher plants. Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A. XLVI, 1 (1936).
28. Kent, N. und Brink, R. A., Growth in vitro of immature Hordeum embryos. Science, 106, 547 (1947).
29. LaRue, C. D., Growth of the Scutellum of maize in culture. Science, 115, 315 (1952).